
Etude de la fonction et des mécanismes d'évolution des séquences répétées centromériques chez les Primates

Sarah Kaddah

Tuteur : Loïc Ponger

Structure et Instabilité des Génomes

MNHN - CNRS UMR 7196 / INSERM U1154 - Sorbonne Universités



Remerciements

Merci à Namrod pour toute la partie sur la bibliographie. Retrouvez ses questions FAQ qui ont permis la rédaction de cette partie.

Merci à f-leb, LittleWhite et Metalman pour leurs conseils et la relecture. Merci à ced et jacques_jean pour la correction orthographique et typographique.

Table des matières

Remerciements	1
1 Introduction	1
1.1 Les séquences centromériques	1
1.2 L'ADN α -satellites	1
1.3 Le sujet de stage	2
2 Matériel et méthode	3
2.1 Choix des espèces	3
2.2 Méthode de classification	3
2.3 Alignement, consensus et phylogénie	4
3 Résultat	4
3.1 Validation de la méthode de classification	4
3.1.1 Résultats du laboratoire	4
3.1.2 Comparaison des familles	4
4 Discussion	6
5 Conclusion	6

1 Introduction

1.1 Les séquences centromériques

-> biblio CENP-A

-> biblio kinetochore

-> info supp sur l'ADN satellite

Le centromère est une structure chromatinienne caractérisé par la présence de CENP-A. Cette protéine, très conservée au cours de l'évolution, est un variant de l'histone H3. Son rôle est de fixer la position du kinétochore par un mécanisme encore peu connu. En effet, le centromère est le site d'assemblage du kinétochore, un ensemble d'ADN et de protéines. Il permet l'attachement du fuseau mitotique pour la ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire chez les eucaryotes. Le centromère et les protéines impliquées sont relativement bien conservés. Au contraire, l'ADN sous-jacent est très diversifié et l'organisation varie d'un taxon à l'autre. Cependant, une caractéristique commune est retrouvée chez toutes les espèces : de l'ADN centromérique répété en tandem nommé ADN satellite. Ces répétitions sont issues d'événements d'amplification, tels les crossovers inégaux, la conversion de gènes, les cercles roulants ou la transposition de séquences.[Malik and Henikoff, 2002 ; Plohl et al. 2012] Ces séquences représentent 5% du génome. Les répétitions s'étendent de 7pb à 3,2kb avec des séquences de 145-180kb le plus souvent.

1.2 L'ADN α -satellites

-> première mise en évidence des AS

->théorie gradient de l'âge

-> travaux sur le gorille à dev

L'ADN satellite chez les Primates est connu sous le nom d' α -satellite. Ces séquences centromériques répétées en tandem sont riches en AT. -> article sur la première découverte

Des études chez l'Homme proposent un modèle évolutif. La répartition des α -satellites suivrait une répartition spécifique selon l'âge des familles. Les familles les plus jeunes s'insèrent au cœur du centromère, repoussant les familles les plus anciennes jusqu'aux régions voisines, appelé péri-centromère.

->Article Shepelev

->Est-ce que je peux utiliser du conditionnel ? OU est-ce que cette théorie est confirmée ?

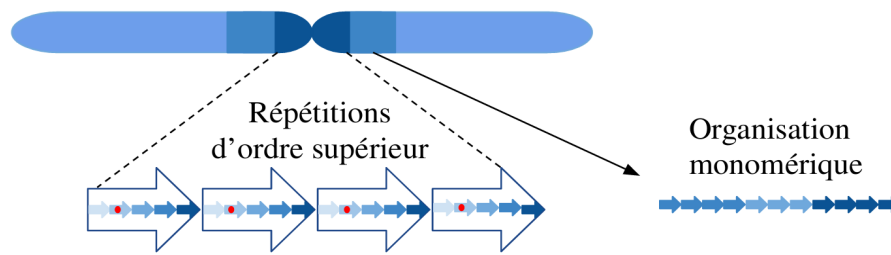


FIGURE 1 – **Organisation spatiale des α -satellites** : Le coeur du centromère (bleu foncé) est organisé en répétition d'ordre supérieur. Le péricentromère (bleu clair) a une organisation monomérique. Un monomère d'une même famille est représenté par une petite flèche de même couleur. Les points rouges représentent les sites de fixation à CENP-B ou pJ α .

Un monomère a une longueur de 171pb et il peut être répété des milliers de fois. Les monomères peuvent être répartis en famille selon leur similarité, les séquences ayant un taux d'identité supérieur à 70%. Ces séquences ont soit une organisation monomérique soit une organisation en répétition d'ordre supérieur (Fig. 1). Dans le premier cas, les séquences d'une même famille sont répétées en tandem. Dans le deuxième cas, une suite de monomères appartenant à différentes familles forme une unité, qui elle est répétée en tandem.

Ces séquences peuvent avoir un site de liaison à la protéine centromérique CENP-B un motif spécifique de 17pb. Cette protéine, qui reconnaît et se fixe sur l'ADN, serait présente chez de nombreuses familles de Primates. La protéine pJ α , une protéine peu caractérisée, reconnaît un motif qui remplace celui de CENP-B.

Les α -satellites ont essentiellement été étudiées chez l'homme. Modèle évolutif avec les centromères en expansion. Une hypothèse concernant l'âge des séquences découle de ces recherches : les séquences les plus récentes apparaissent au coeur du centromères, déplaçant les plus anciennes au péricentromère. D'autres études chez le gorille ont été faites. Le rôle des α -satellites est encore mal connu.

1.3 Le sujet de stage

enchaine sur l'étude chez les cerco, une autre étude de séquençage haut débit

-travaux précédents limités (expliquer pk). Les méthodes basées sur l'alignement et la phylogénie sont très limitées, le jeu de données étant trop grand. Les méthodes n'étaient pas objectives (quelles méthodes ??). De plus, chez d'autres espèces de Primates, les informations sont trop dispersées et aucune comparaison interspèce n'a été faite.

L'équipe d'accueil de mon stage "ADN répété, Chromatine, Evolution" ou ARChE, a récemment développé une approche de séquençage haut débit, ciblée sur les séquences α -satellites chez deux espèces de Cercopithèques. Une autre étude avec un grand nombre de séquences concerne le Gorille [Catacchio] avec l'utilisation de fragments relativement longs.

L'objectif de ce stage est de comprendre la fonction des α -satellites et leur mécanisme d'évolution. Je vais choisir plusieurs espèces de Primates. Je vais utiliser une méthode de classification automatisée améliorée du laboratoire [Florence Jornod] pour classer les séquences en familles. Ce programme permet de traiter des centaines de milliers de séquences sans quelque soit le nombre de séquences ou la taille des familles. Je vais dans un premier temps appliquer cette technologies au données issues de ce séquençage. Ensuite, je vais étudier d'autres espèces. Puisque toutes les espèces sont étudiées par la même méthode, une comparaison inter espèce est envisageable.

2 Matériel et méthode

2.1 Choix des espèces

Les critères de sélections dépendent de la disponibilité des séquences de qualité. Deux espèces du laboratoire, les *Cercopithèques solatus* et *pogonias*, et deux espèces proches, le *Macaca fascicularis* et le *Chlorocebus sabaeus*, sont choisies.

2.2 Méthode de classification

Cette méthode [f.jornod] répartit des séquences α -satellites en familles selon la similarité. La classification est hiérarchique dichotomique. Dans un premier temps, les séquences sont séparées en fonction de la fréquence des 5-mers qui composent les séquences, d'après les études sur les *Cercopithèques*.

La classification est suivie d'une double validation des sous-groupes. D'une part la taille du sous-groupe est vérifiée. La taille minimale d'une famille est fixée à 100. Si un groupe atteint 100 séquences, il n'est pas redivisé. D'autre part les deux groupes doivent être distincts. Pour cela le *matepair* est évalué. C'est la proportion de monomères ayant son plus proche voisin dans le même groupe. Des valeurs *matepairs* élevées indiquent des sous-groupes bien homogènes et séparés validant la classification tandis qu'un seuil *matepair* plus faible entraîne plus de classes. Si les *matepairs* sont au dessus d'un certain seuil, les deux sous-groupes sont ajoutés séparément à la file pour être potentiellement redivisés ultérieurement. En revanche, si au moins une des valeurs

de *matepair* est au dessous de ce seuil, les sous-groupes sont considérés comme formant un seul groupe et le groupe initial est sauvegardé comme une famille unique.

La séparation des séquences se fait de façon itérative en boucle. Chaque tour implique une analyse en composante principale (ACP), une classification hiérarchique et une analyse discriminante linéaire (LDA) si le jeu de données est conséquent. L'ACP est faite sur la table des 5-mers pour réduire les dimensions du jeu de données en minimisant la perte d'information et obtenir des variables indépendantes utilisables pour la LDA. Le nombre de composantes est fixé à 1024. Ensuite des distances euclidiennes sont calculées entre toutes les paires de séquences dans l'espace défini par les M premières composantes de l'ACP. Puis la méthode de classification hiérarchique de Ward forme des classes de façon à minimiser l'inertie interclasse. Cependant, si le jeu de données dépasse 110 000 séquences, le calcul des distances devient pesant. La LDA entre alors en jeu. Cette méthode d'apprentissage utilise un sous-jeu de données formé par des séquences tirées aléatoirement. Le modèle construit est appliqué sur toutes les séquences.

2.3 Alignement, consensus et phylogénie

3 Résultat

3.1 Validation de la méthode de classification

3.1.1 Résultats du laboratoire

Le laboratoire a effectué un séquençage sur les *C. solatus* et *pogonias*. Les séquences α -satellites obtenues sont divisées en nucléotides de 5-mers, puis triées par Analyse de Classification Hiérarchique (HCA) et par Analyse Discriminante Linéaire (LDA). Chez le *C. solatus*[article 1 de Laurianne] deux grandes familles monomériques (C1 et C2) et un HOR d'ordre 2, composé des familles C3 et C4, sont identifiés. Chez le *C. pogonias*[article2 de Laurianne], deux familles supplémentaires (C5 et C6) ont été détectées. Ces *Cercopithèques* ne disposent pas du site de fixation pour la protéine CENP-B. Au contraire, le site de fixation pour la protéine pJ α est présent dans 85% des α -satellites en moyenne, excepté la famille C3 qui n'en possède pas.

3.1.2 Comparaison des familles

Le programme identifie 13 et 14 familles chez le *C. solatus* et *pogonias* respectivement. Seules les familles de plus de 100 séquences sont conservées. Cette sélection implique 6,99% et 1.63% en perte d'information pour ces deux espèces. Les séquences restantes, n'ayant pas été classées dans

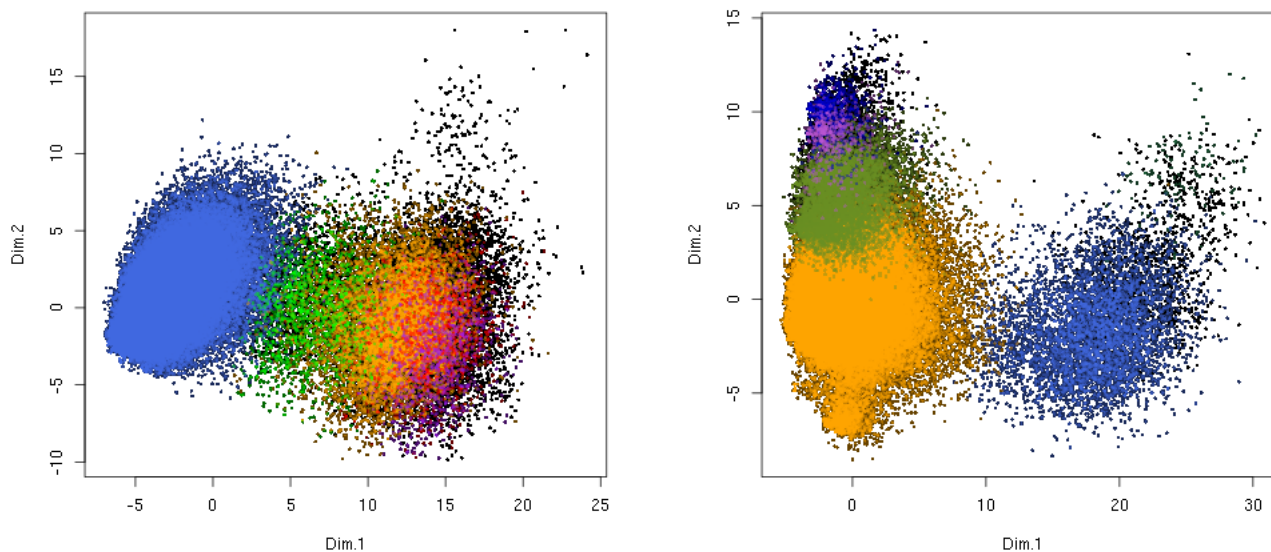


FIGURE 2 – ACP des 5-mers chez *C.solatus* (à gauche) et *C.pogonias* (à droite) : Les familles communes sont C1 (orange) et C2 (royalblue). C3 (seagreen) et C5 (olivedrab) sont visibles seulement chez pogonias. Les familles qui divisent C1 sont la 2 (green), 73 (red) et 177 (purple) et chez pogonias la 11 (mediumblue) et 51 (mediumorchid).

une famille assez grande ou étant peut-être des séquences atypiques, ne sont pas prises en compte dans l'analyse.

Le *C.solatus* a deux grandes familles de 82911 et 9216 monomères, une classe intermédiaire de 1519,1267 et 898 séquences. Le *C.pogonias* a 3 grandes familles d' α -satellites qui ont 94594, 8319 et 5202 séquences, deux familles intermédiaires de 998 et 664 monomères. Les familles restantes ont quelques centaines de séquences et sont très petites comparées aux familles citées ci-dessus. Une ACP permet de visualiser et de comparer les familles (Figure 2).

La famille C1 est divisée en plusieurs familles pour les deux espèces. La famille C2 péricentromérique est retrouvée chez les deux espèces et forme un complexe homogène. Les dimères sont une famille d'une centaine de monomères. La famille C3 est retrouvée chez le *C.pogonias* seulement, bien qu'elle n'ait pas été étudiée dans les études du *C.pogonias*. La famille C4 n'est pas détectée. Cette famille a probablement été divisée en petites classes. Elles ne sont donc pas détectées. La famille C5 est retrouvée. C6 et C1 ont été classés comme étant une même famille.

4 Discussion

5 Conclusion

Résumé

Votre résumé commence ici... ...

Abstract

Abstract begins here... ...